 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.07.18 J South Med Univ, 2016, 36(7): 974-978

临床研究

microRNA-107在肝癌中的表达及临床意义

肖芦山[1],邹雪晶[1],胡 威[2],刘 莉[1]
南方医科大学南方医院[1]肝脏肿瘤中心,[2]放疗科,广东 广州 510515

摘要:目的 检测microRNA-107(miR-107)在肝癌中的表达及意义,并探讨其对肝癌细胞增殖能力的影响。**方法** 利用公共基因表达数据库(TCGA数据库和GEO数据库)中的肝癌microRNA表达谱数据库,分析miR-107在肝癌及癌旁的表达水平;收集22例肝癌及其相应癌旁新鲜组织标本,qRT-PCR方法检测miR-107的表达水平;收集53例石蜡包埋的肝癌组织标本,qRT-PCR方法检测miR-107表达水平并分析其在肝癌中的临床意义。在人肝癌细胞株Huh7中过表达或沉默miR-107,通过MTT方法检测其对肝癌细胞增殖能力的影响。**结果** miR-107在肝癌组织中的表达显著高于其在癌旁组织中的表达,差异具有统计学意义(P<0.05)。在肝癌组织中,miR-107与肿瘤大小呈正相关关系(P=0.032)。体外实验结果表明,过表达miR-107后肝癌细胞增殖能力明显增强(P<0.0001),而沉默miR-107后细胞增殖能力明显降低(P<0.0001)。**结论** miR-107在肝癌中表达上调,其高表达与肝癌细胞增殖密切相关,miR-107可能是一个与肝癌的发生发展相关的基因。

关键词:microRNA-107;肝癌;增殖

Expression of microRNA-107 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

XIAO Lushan[1], ZOU Xuejing[1], HU Wei[2], LIU Li[1]
[1]Hepatology Unit of Department of Infectious Diseases, [2]Department of Radiation Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-107 (miR-107) and its functional role in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The gene chip data of HCC obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database and the Cancer Genome Atlas (TCGA) database were used to analyze the expression levels of miR-107 in liver cancer. Twenty-two pairs of fresh surgical specimens of HCC and adjacent tissues and 53 paraffin-embedded specimens of HCC were examined for miR-107 expression by qRT-PCR. The correlation of the expression levels of miR-107 with the clinicopathologic characteristics of the patients were analyzed. The role of miR-107 in regulating the proliferation of hepatocellular carcinoma cells were determined by MTT assay in Huh7 cells transfected with a miR-107 mimic or inhibitor. **Results** The expression levels of miR-107 were significantly up-regulated in HCC tissues as compared to the adjacent tissues (P<0.05) in positive correlation with the tumor size (P<0.032). Transfection with miR-107 mimics significantly promoted the cell proliferation (P<0.0001) while miR-107 inhibitor inhibited the cell proliferation (P<0.0001). **Conclusion** The expression of miR-107 is up-regulated in HCC tissues and its expression levels are correlated with HCC cell proliferation, suggesting its role as a potential oncogene in liver cancer.

Key words: microRNA-107; hepatocellular carcinoma; proliferation

肝细胞性肝癌(下称肝癌)是我国常见的恶性肿瘤之一[1]。目前肝癌治疗仍然以外科手术切除或肝移植为主,但由于该病起病隐匿,多数患者确诊时已处于中晚期,而失去了手术治疗时机。因此,发现和鉴定可用于肝癌早期诊断的分子指标,对提高肝癌的早诊率和加强患者的预后有着重要的临床意义。

微小RNA(miRNA)是一类内源性非编码RNA,长度为18~25个核苷酸。近年来的研究表明其在多种肿瘤中均与肿瘤发生、发展、复发、转移等密切相关,发挥着癌基因及抑癌基因的功能[2-3]。miRNA作为新兴的生物标志物逐步受到研究者的关注,并且有望成为肿瘤诊断标志物及治疗的潜在靶点。

已有研究表明miR-107在多种实体肿瘤中异常表达,其异常表达与肿瘤的发生发展密切相关,并可作为判断不良预后的分子指标。但是,目前的研究表明,miR-107在不同的肿瘤中发挥相反的作用。例如,在肾透明细胞癌中,miR-107表达下调,发挥抑癌基因的作用,且与肿瘤的大小、侵袭、转移呈负相关[4]。然而,在结肠癌中,其表达上调,发挥着癌基因的作用,且与肿瘤的不良预后呈正相关关系[5]。由此推测,miR-107发挥作用可能具有组织或肿瘤依赖性。在肝癌中miR-107的研究报道较少,因此,本研究拟探讨miR-107在肝癌组

收稿日期:2015-10-22
基金项目:国家自然科学基金(81172056,81372283)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81172056, 81372283).
作者简介:肖芦山,硕士,E-mail: 15622178423@163.com
通信作者:刘 莉,医学博士,教授,博导,E-mail: 18602062738@163.com

织中的表达及临床意义,并初步探讨miR-107在肝癌中的作用机制。

1 资料和方法

1.1 样本收集

1.1.1 组织标本的来源 收集2009年9月~2012年10月在南方医科大学南方医院接受肝癌切除手术治疗的22例肝癌患者的肝癌及相应癌旁组织标本。收集南方医院病理科2005年9月~2010年8月石蜡包埋的53例肝癌组织标本。所有患者术前均未行放射、化疗及射频消融等治疗,且所有组织标本经术后病理学检查均证实为肝细胞性肝癌。

1.1.2 临床资料 石蜡包埋的53例患者中,男性41例,女性12例,年龄>55岁22例,年龄≤55岁31例。TNM分期为I~Ⅱ期47例,Ⅲ~Ⅳ期6例。肿瘤大小>5 cm 34例,肿瘤大小≤5 cm 19例。肝外转移3例,未转移50例。复发20例,无复发33例。

1.2 材料

人肝癌细胞株Huh7购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清、高糖DMEM培养基、培养基购自GIBCO;胰蛋白酶消化液购自吉诺公司;Lipofectamine RNAiMAX、TRIzol Reagent 购自 Invitrogen; SYBR® PrimeScriptTMRT-PCR Kit (Perfect Real Time)购自TAKARA;miR-107特异性引物、内参U6引物由上海英潍捷基公司合成;miR-107 模拟物(mimics),AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA、AUAGCCCUGUACAAUGCUGCUUU及对应阴性对照(negative control, nc),序列:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT、ACGUGACACGUUCGGAGAATT 和抑制剂(inhibitor),序列:UGAUAGCCCUGUACAAUGCUGCU,对应阴性对照(negative control, nc),序列:CAGUACUUUUGUGUAGUACAA由上海吉玛公司合成;四氮唑蓝(MTT)粉末、二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司。

1.3 方法

1.3.1 数据组 基因数据来源:TCGA数据集(TCGA cohort)来源于TCGA数据库(https://tcga-data.nci.Nih. gov/tcga/),数据包含372个肝癌组织样本及50个癌旁组织样本。GSE6857数据集(GSE6857 cohort)、GSE10694数据集(GSE10694 cohort)、GSE21362数据集(GSE21362 cohort)来源于GEO数据库(http://www. Ncbi. Nlm.nih. gov/geo)。GSE6857数据集由Xin Wei Wang提交,包括241对肝癌样本[6];GSE 10694数据集由Li W提交,包括78对肝癌样本及10例正常肝样本[7];GSE21362数据集由Akira Myomoto提交,包括73对肝癌样本[8]。

1.3.2 细胞培养 人肝癌细胞株Huh7采用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基培养,置于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况,2~3 d用胰酶消化、传代培养,取生长状态良好的细胞用于实验。

1.3.3 实时定量RT-PCR(qRT-PCR) 按照说明书步骤用Trizol提取收集细胞、肝癌组织及癌旁组织中的总RNA,对A_{260}/A_{280}在1.8~2.0之间的RNA标本进行逆转录,利用PrimeScript逆转录PCR(RT-PCR)试剂盒将总RNA逆转录出miR-107和U6 snRNA(作内参)的cDNA。我们用SYBR Premix PCR试剂盒按照说明书进行实时定量PCR实验,所有实验重复3次。我们用delta-CT求基因相当表达量方法[9]分析miRNAs的表达水平。

1.3.4 miR-107 mimics和inhibitor的转染 按照说明书我们用Lipofectamine RNAiMAX转染试剂转染miR-107 mimics和inhibitor入肝癌细胞中。在转染12 h前先将细胞铺到6孔板中。每孔先将50 pmol miR-107 mimics (inhibitor)或阴性对照序列与4 μL LipofectamineRNAiMAX分别加至250 μL Opti-MEM中孵育5 min,然后将两者轻轻混合,室温孵育20 min后加入到各个孔中。在培养箱中培养48 h即可进行下一步实验。

1.3.5 细胞增殖实验 细胞增殖活力是根据四氮唑比色实验即MTT实验来测定。转染24 h后,细胞分两组(nc组,inhibitor和mimics组)进行消化,用DMEM培养基重悬制成单细胞悬液,铺96孔板,每孔800个细胞96孔板的左上孔设为空白孔,只加培养基,不加MTT及细胞,用于设备调零,每组设6个复孔。细胞贴壁后每天同一时间用一块板,每孔加20 μL浓度为5 mg/mL的MTT试剂,细胞再避光培养4 h。然后去上清,用100 μL DMSO溶甲瓒沉淀,37 ℃振摇孵育10 min。最后在酶标仪上测定各孔490 nm的吸光度A值。

1.4 统计分析

所有计量数据采用均数±标准差表示,采用SPSS20.0统计软件进行分析,样本均数的比较采用Student's t检验,双侧$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-107在肝细胞癌组织中表达上调

TCGA及GEO肝癌microRNA表达谱数据结果示,miR-107在肝细胞癌组织中表达显著高于其在癌旁组织中的表达($P<0.05$,图1)。22对新鲜肝癌组织中miR-107表达的检测结果验证了以上数据库结果($P<0.05$,图2)。

2.2 miR-107的表达水平与肝细胞癌患者的临床病理联系

研究发现在肝癌患者中,miR-107表达水平与肿瘤的大小(P=0.032)呈正相关,而与患者性别(P=0.156)、年龄(P=0.378)、肝硬化水平(P=0.615)、甲胎蛋白水平(P=0.279)、门静脉癌栓(P=0.31)、巴塞罗那分期(P=

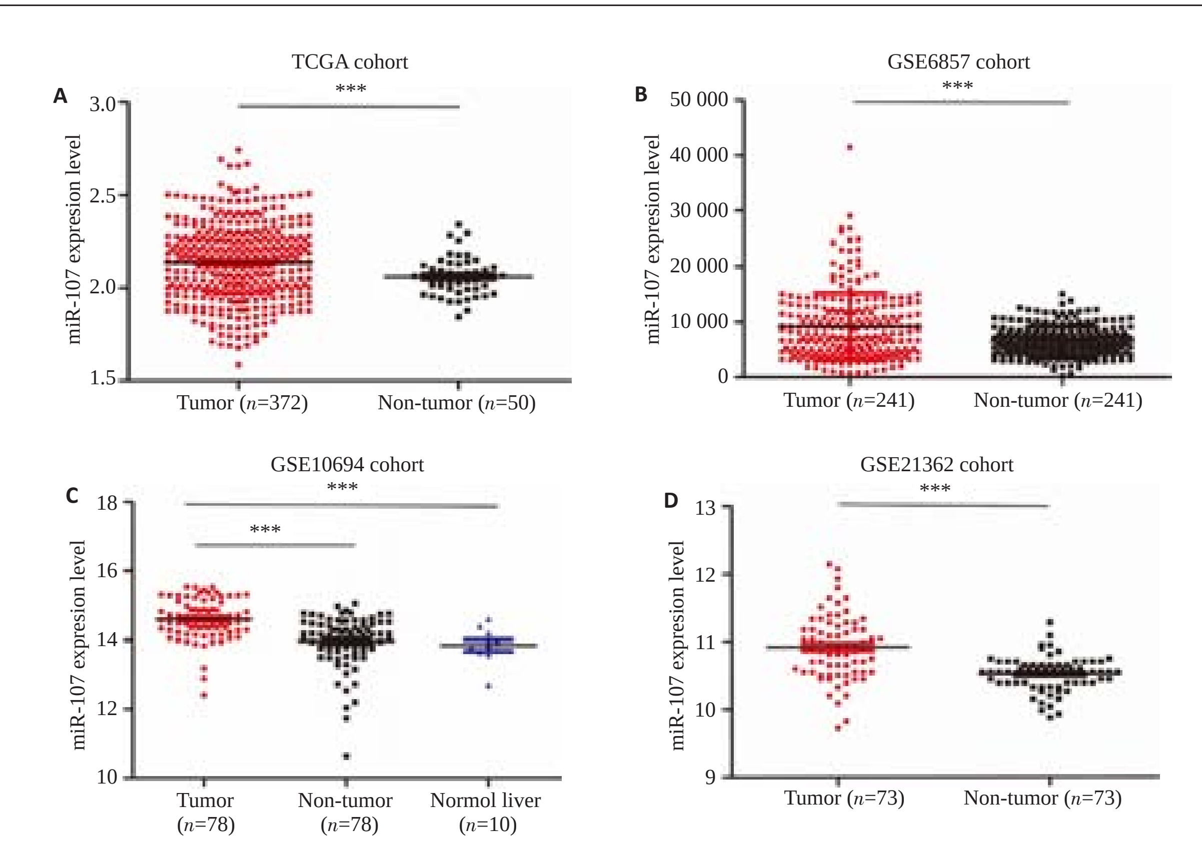


图1 miR-107在数据库中肝细胞癌组织及癌旁组织中的表达水平比较

Fig.1 Expression levels of miR-107 in HCC tissues. *A*: miR-107 expression in TCGA cohort; *B*: miR-107 expression in GSE6857 cohort; *C*: miR-107 expression in GSE10694 cohort; *D*: miR-107 expression in GSE21362 cohort. ****P*<0.001 *vs* normal tissues.

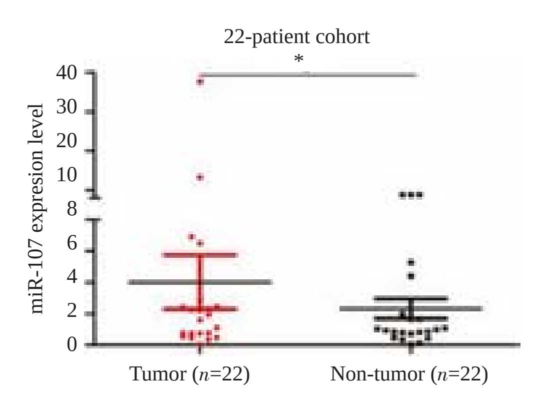


图2 miR-107在肝细胞癌组织及对应癌旁组织中的表达水平比较

Fig.2 Expression Levels of miR-107 in 22 pairs of human HCC tissues and adjacent noncancerous tissues. **P*<0.05 *vs* normal tissues.

0.058)、肿瘤性质(*P*=0.607)、是否复发(*P*=0.292)、是否转移(*P*=0.982)尚未发现有相关性(表1)。

2.3 miR-107促进肝癌细胞增殖

用Huh7细胞过表达miR-107后，细胞增殖能力明显增强。相反，沉默miR-107后，细胞增殖能力明显减弱(*P*<0.05，图3)。

3 讨论

目前的研究表明，许多miRNA在肿瘤组织中表达失调，并且呈现肿瘤组织特异性的表达方式。miRNA的这个特点为其在肿瘤的诊断和治疗的应用提供了新的途径。miR-107位于人类10号染色体，其在肿瘤中呈现过高或过低表达，发挥着癌基因和抑癌基因的作用。例如，其在结肠癌高表达，而在肾癌中低表达[4-5]。因此，深入探讨miR-107在不同肿瘤中的作用有着非常重要的意义。本文主要探讨其在肝癌中的表达及初步探讨其作用机制。我们利用TCGA及GEO数据库中肝癌microRNA表达谱数据进行统计分析，结果提示miR-107在肝癌组织中高表达。提示异常表达的miR-107可能在肝癌中发挥着癌基因的作用。

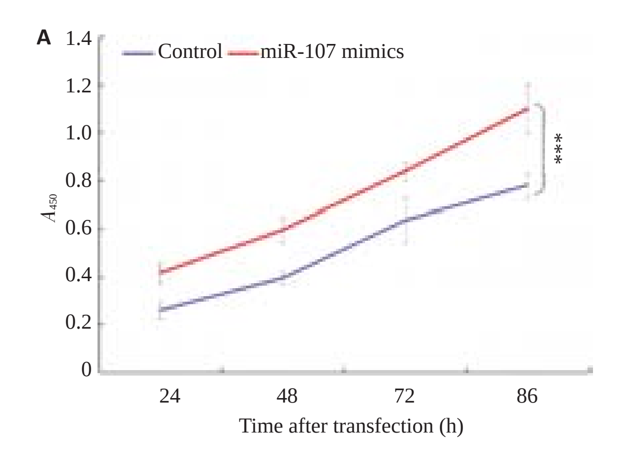
本研究进一步利用qRT-PCR方法检测了22对新鲜肝癌及其对应的癌旁组织中miR-107的表达情况，也发现miR-107在肝癌组织中高表达，结果与之前数据库分析一致。为了更深入地探讨miR-107在肝癌中的临床意义，我们进一步分析了53例石蜡包埋的肝癌组织miR-107的表达水平与肝癌临床病理特征间的相关性，发现miR-107与肿瘤大小呈正相关。以上结果提示miR-107可能与肝癌细胞的增殖能力相关。为了证明这一点，我们选取肝癌细胞株Huh7细胞进行过表达和沉默后检测其增殖能力，结果表明miR-107可增强肝癌细胞增殖能力。这与Jun-Hong Hu等报道miR-107促进hepG2细胞增殖的结果相一致[10]，然而，贾振亚等曾

表1 肝癌组织中miR-107的表达与临床病理参数的关系

Tab.1 Correlation between miR-107 expression and clinicopathologic features of the HCC patients

Factor	MiR-107 expression levels		P
	High expression	Low expression	
Gender			
Male	25	16	0.156
Female	10	2	
Age (years)			
≤55	22	9	0.378
>55	13	9	
Edmondson grade			
Ⅰ+Ⅱ	31	16	0.973
Ⅲ+Ⅳ	4	2	
Liver cirrhosis			
With	22	10	0.615
Without	13	8	
AFP (ng/mL)			
≤20	13	4	0.279
>20	22	14	
Portal vein tumor thrombus			
No	27	16	0.31
Yes	8	2	
No. tumor			
Solitary	27	15	0.607
Multiple	8	3	
Tumor size (cm)			
≤5	9	10	0.032*
>5	26	8	
BCLC stage			
A	20	15	0.058
B+C	15	3	
Relapse			0.292
Yes	15	5	
No	20	13	
Extrahepatic metastasis			0.982
Yes	2	1	
No	33	17	

Abbreviations: AFP, alpha-fetoprotein; BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer. *The values had statistically significant differences.



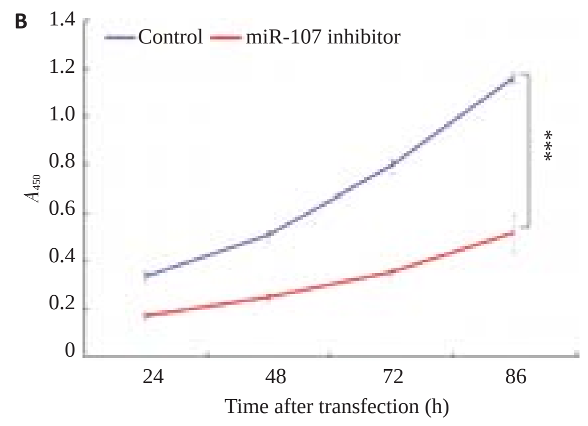


图3 上调(下调)miR-107 的表达促进(抑制)肝癌细胞的增殖

Fig.3 Transient transfection of miR-107 mimics (*A*) and inhibitor promoted and inhibited the cell proliferation of HCC cell line, respectively, shown by the results of MTT assay. Data are shown as *Mean* ± *SD* from 3 independent experiments. ***P<0.001 *vs* nc.

报miR-107可抑制hepG2细胞的增殖[11]。本研究首先从临床分析中得到miR-107与肿瘤大小呈正相关,并且体外实验证实其具有促进增殖作用。我们猜测这可能由于细胞生物学特性及下游靶基因的不同所致,也可能是贾振亚等的研究结果仅局限在细胞水平所致。

综上所述,本研究对TCGA及GEO数据集、新鲜肝癌标本、石蜡标本,肝癌细胞株等多个方面进行研究分析,发现miR-107可能是一个肝癌发生发展相关的基因。提示,miR-107可能成为肝癌治疗的新的靶点, 也可能成为观察肝癌快速增殖的一个新指标。然而本文也存在一些不足,如样本量少,未进行体内实验以及未进行靶基因的探讨。我们下一步将采取加大样本量和体内动物实验的方法来深入探讨miR-107在HCC中的生物学作用、机制及临床意义。

参考文献:

[1] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会. 中华医学会肝病学分会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治的专家共识[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(6): 403-10.

[2] Sayed D, Abdellatif M. Micrornas in development and disease[J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 827-87.

[3] Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, et al. MicroRNAs in human cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 774(4): 1-20.

[4] Song N, Ma X, Li H, et al. microRNA-107 functions as a candidate tumor suppressor gene in renal clear cell carcinoma involving multiple genes[J]. Urol Oncol, 2015, 33(5): 205. e1-11.

[5] Chen HY, Lin YM, Chung HC, et al. miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4 [J]. Cancer Res, 2012, 72(14): 3631-41.

[6] Budhu A, Roessler S, Zhao X, et al. Integrated metabolite and gene expression profiles identify lipid biomarkers associated with

progression of hepatocellular carcinoma and patient outcomes[J]. Gastroenterology, 2013, 144(5): 1066-1075. e1.

[7] Li W, Xie L, He X, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2008, 123(7): 1616-22.

[8] Sato F, Hatano E, Kitamura K, et al. MicroRNA profile predicts recurrence after resection in patients with hepatocellular carcinoma within the Milan Criteria[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16435.

[9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-8.

[10] Zhang JJ, Wang CY, Hua L, et al. miR-107 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Axin2[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 5168-74.

[11] 贾振亚, 曹 静, 范文洁, 等. miR-107对HepG2细胞增殖和细胞周期的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2014(10): 1400-3, 1404.

（编辑:孙昌朋）

（上接973页）

[6] Korreman S, Persson G, Nygaard D, et al. Respiration-correlated image guidance is the most important radiotherapy motion management strategy for most lung cancer patients[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 83(4): 1338-43.

[7] Kipritidis J, Hugo G, Weiss E, et al. Measuring interfraction and intrafraction lung function changes during radiation therapy using four-dimensional cone beam CT ventilation imaging[J]. Med Phys, 2015, 42(3): 1255-67.

[8] Sonke J, Wolthaus J, Rossi M, et al. Four dimensional cone beam CT for verification of radiotherapy for lung cancer[J]. Lung Cancer, 2005, 49(2): S52.

[9] Brehm M, Berkus T, Oehlhafen M, et al. Motion-Compensated 4D Cone-Beam computed tomography [C]//2011 IEEE NUCLEAR SCIENCE SYMPOSIUM AND MEDICAL IMAGING CONFERENCE (NSS/MIC), 2011: 3986-93.

[10] Brehm M, Paysan P, Oelhafen M, et al. Artifact-resistant motion estimation with a patient-specific artifact model for motion-compensated cone-beam CT[J]. Med Phys, 2013, 40(10): 101913.

[11] Sidky EY, Pan X. Image Reconstruction in circular cone-beam computed tomography by constrained, total-variation minimization [J]. Phys Med Biol, 2008, 53(17): 4777-807.

[12] Zhang H, Ouyang L, Huang J, et al. Few-view cone-beam CT Reconstruction with deformed prior image[J]. Med Phys, 2014, 41 (12): 121905.

[13] Leng S, Tang J, Zambelli J, et al. High temporal resolution and streak-free four-dimensional cone-beam computed tomography[J]. Phys Med Biol, 2008, 53(20): 5653-73.

[14] Zhang Y, Tong X, Yang T, et al. Multi-model estimation based moving object detection for aerial video[J]. Sensors (Basel), 2015, 15(4): 8214-31.

[15] Bonettini S, Prato M. A new general framework for gradient projection methods[J]. Eprint Arxiv, 2014, 1406, 6601.

[16] Rit S, Oliva1 Vila M, Brousmiche S, et al. The Reconstruction Toolkit (RTK), an open-source cone-beam CT reconstruction toolkit based on the Insight Toolkit (ITK)[C]. J Physics: Conf Series, 2014, 489, 012079.

[17] Alasti H, Cho YB, Vandermeer AD, et al. A novel four-dimensional radiotherapy method for lung cancer: imaging, treatment planning and delivery[J]. Phys Med Biol, 2006, 51(12): 3251-67.

[18] Sonke J, Zijp L. Remeijer P and Herk M. respiratory correlated cone beam CT[J]. Med Phys, 2005, 32(4): 1176-86.

（编辑:经 媛）